Aus dem Hygienischen Institut der Universität Rostock
Direktor: Professor Dr. von Wasielewski

Untersuchungen über „Zwergstämme" (Gildemeister) von Bact. typhi.

Dissertation

zur

Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde einer Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Wolfgang Heber
approbierter Zahnarzt aus Döbeln i. Sa.

Rostock 1935
Verlag Gustav Neumann, Rostock
Druck von Ernst Vetter, Rochlitz

Referent: Professor Dr. Fr. W. Winkler
Korreferent: Professor Dr. Kollath

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Disposition

A. Die bisherigen Beobachtungen über ein sog. Bact. typhi mutabile (Jacobsen) und ähnlicher atypischer Typhusbakterien 5

B. Untersuchungen an 8 eigenen Stämmen 8

1. Morphologie der Bakterien und ihrer Kolonien 8
2. Abspaltung normalwachsender Stämme 9
3. Kulturelle Untersuchungen 10
   a) Allgemeine Untersuchungen und Autoklavierung 10
   b) Untersuchungen zur Aufhebung der Hemmung 11
   c) Gärungsvermögen 13
   d) Säurebildung 13
   e) Verhalten gegenüber Bakteriophagen 14
   f) Serologische Untersuchungen 15

C. Zusammenfassung 18

A. Die bisherigen Beobachtungen über ein sog. Bact. typhi mutabile (Jacobsen) und ähnlicher atypischer Typhusbakterien

Im Jahre 1927/28 brach in Güstrow eine kleine Typhusepidemie mit 18 Erkrankungen aus. Bei den bakteriologischen Untersuchungen wurden im Mecklenburgischen Landesgesundheitsamt Typhusbakterien gefunden, die auf einigen festen Nährböden ein von dem Normalen abweichendes Wachstum zeigten. Die Kolonien dieser Typhusstämme waren auf gewöhnlichem Agar und Drigalskiagar klein wie Stecknadelköpfe. Derartige Stämme wurden bei allen Kranken aus Blut, Stuhl und auch aus Urin gezüchtet, doch kamen daneben, wenn auch nicht bei allen Kranken auch normale groß wachsende Kolonien von Typhusbakterien vor.

Unter den Typhusfällen in Rostock, bei denen im Frühjahr 1934 Typhusbakterien gefunden wurden, befand sich wieder einer, in dem der Krankheitserreger — aus Stuhl und Urin gezüchtet — dieselbe eigenartige Koloniekleinheit zeigte.

Mit solchen abnormen Typhusstämmen haben sich bereits andere, besonders Jacobsen, Fromme, Goebel und Gildemeister befaßt.

1910 berichtet Jacobsen von einer Epidemie in einer Irrenanstalt Dänemarks, bei der Typhusbakterien selbst aus Material von sicher Typhuskranken auf Drigalskiagar nicht gezüchtet werden konnten. Erst die 26. Probe Blut, aus Rindergalle weiterverimpft auf Kalbsbouillonagar, ergab typhusverdächtige Kolonien. Auf Drigalskiagar wuchs dieser Stamm zunächst nicht, später nur in ganz winzigen Kolonien, ähnlich auf gewöhnlichem Agar, während er auf Endoagar normales Wachstum zeigte. Nach 3tägigem Bebrüten zeigten sich auf Drigalskiagar zwischen den winzigen Kolonien solche von normaler Größe, die — isoliert weitergezüchtet — bei allen weiteren Untersuchungen keine Abweichungen mehr von Normalstämmen aufwiesen. Jacobsen glaubte, eine echte Mutation im Sinne von de Vries vor sich zu haben, da es ihm nie gelang, diesen neuen Stamm in die alte kleinwachsende Form zurückzuführen.

Lackmus-Mannitbouillon wurde nur langsam vergoren, erst nach zirka 50 Stunden konnte eine Säurebildung festgestellt werden, während eine solche bei den Kontrollstämmen schon nach 12 Stunden auftrat. Jacobsen fand auch Abweichungen vom Normalen bei der Agglutination. Erstens trat sie viel später ein, und zweitens war sie bedeutend geringer als bei seinen Kontrollstämmen.

Bei Verwendung von Endo- und Padlewskiagar trat nie eine Wachstumshemmung auf.

Seine Vermutung, daß Farbstoffe (Kristallviolett) oder Zuckerzusatz die Hemmung verursachen würden, erwies sich als irrig. Dagegen gelang es ihm,

durch nur ¼stündige Autoklavierung seiner Nährböden normales Wachstum zu erzeugen. Ebenso hob der Zusatz von Na_2SO_3 analog den im Endoagar verwendeten Mengen von 0,1—2,5% die Hemmung auf. Auch durch Zusatz von Hühnereidotter oder Ascites erzielte er das gleiche Resultat. Dagegen war Hühnereiweiß nicht hemmungsaufhebend. Eine Erklärung für diese Vorgänge konnte Jacobsen nicht geben. Er nannte das von ihm gefundene Bacterium Bact. typhi mutabile.

Ähnliches berichtet Fromme 1911. Er fand bei einer im Alter von 49 Jahren an Typhus verstorbenen Lumpenhändlerin in Galle, Milz- und Lebergewebe, Sputum, Blut und Mesenterialdrüse Typhusbakterien, die sich bei allen Untersuchungen gleichmäßig verhielten. Es waren lebhaft bewegliche Stäbchen, die bei 1 : 1000 sofort, bei 1 : 100 000 Immunserumverdünnung angedeutet nach 24 Stunden agglutinierten. Eine Unterscheidung von Normalstämmen war bei dieser starken Agglutinabilität nicht möglich. Auf Drigalskiplatten und gewöhnlichen Agarplatten trat starke Wachstumshemmung auf. Es zeigten sich nur längs des Impfstriches zarte, körnige Kolonien; ebenso auf gewöhnlichem Agar. Die Kolonien hatten hier einen Durchmesser von 1—1½ mm.

Außer diesen eigenen Stämmen standen Fromme vom gleichen Fall in anderen Instituten gewonnene Kulturen zur Verfügung, sechs im ganzen, die sich völlig gleich verhielten. Sonderbar und nicht geklärt ist, daß das abweichende Verhalten bei den Stämmen nicht von vornherein vorhanden gewesen ist, sondern in den an zwei Stellen gewonnenen Kulturen erst aufgetreten sein soll. Es ist wohl die Annahme naheliegend, daß eine Mischkultur groß- und kleinwachsender Bakterien vorlag, aus der Zufall und gute Beobachtung die kleinwachsende Variante isolierten.

Die Säurebildung war nicht konstant, aber stets geringer als bei den Normalstämmen. Es gelang Fromme auch nicht, Mutationskolonien zu finden, auch blieb die Hemmung bei einmaliger kurzer Autoklavierung bestehen. Sie wurde aber aufgehoben durch Zusatz von 0,1—1% Na_2SO_3; ebenso verhielt sich Natrium sulfuricum. Auch Zugabe verschiedener Eiweißstoffe (Menschenblut, -serum, Kaninchenblut, Ascites) zum Agar konnte die Hemmung wenigstens teilweise aufheben, nicht aber Eiweiß, deutlich Eigelb. Auf diese Weise großgewordene Stämme wuchsen, auf gewöhnlichen Drigalskiagar überimpft, wieder klein wie am Anfang. Für Tiere (Meerschweinchen) war der Stamm nicht pathogen.

Einen ähnlichen Stamm hat auch Goebel 1915 beschrieben. Auch hier fanden sich bei einem an einem schweren Typhus erkrankten 29jährigen Bergarbeiter zu Beginn in den Ausscheidungen nie Typhusbakterien. Erst eine spätere Untersuchung — man vermutete in ihm einen Dauerausscheider — zeigte im Urin positiven Befund. Auf Drigalskiagar wuchsen auch hier nur kleinste, kaum sichtbare, bläuliche Kolonien, während auf Endoagar normales Wachstum auftrat. Überimpfte er aber die großen Endokolonien auf Drigalskiagar, so wuchsen wieder nur ganz kümmerliche Kolonien. Seine Schrägagarkultur glich mehr einer von Streptokokken als einer von Typhusbakterien. Auf allen flüssigen Nährböden verhielten sich diese Typhusbakterien wie normale. Auch bei der Agglutination war kein Unterschied vom Normalen festzustellen. Mikroskopisch fand Goebel ein gut bewegliches, gramnegatives, kurzes Stäbchen. Sein Stamm wurde also als ein atypischer

direkt und wiederholt aus dem Kranken herausgezüchtet, er entstand in seinen besonderen Eigenschaften nicht erst im Laufe seines Lebens auf künstlichen Nährböden.

Im Gegensatz zu Jacobsen beobachtete Goebel ebensowenig wie Fromme Mutationskolonien; kurze Autoklavierung der Nährböden hob auch bei ihm die Hemmung nicht auf. Nur durch Zusatz von Na_2SO_3 gelang es, sie zu beseitigen. Sein atypisches Typhusbakterium war für Tiere pathogen; welche Tiere, gibt er nicht an, wahrscheinlich Meerschweinchen.

Einen ähnlichen Befund beschreibt Gildemeister 1916. Und zwar fand er bei der Blutuntersuchung eines unter Typhusverdacht erkrankten Mannes auf Drigalskiagar feinste, streptokokkenähnliche, durchsichtige Kolonien, die den Nährboden nicht veränderten. Bei Stuhluntersuchungen waren ebenfalls zweimal solche kleine Kolonien zu finden, während eine spätere Nachuntersuchung nur normale Typhusbakterien brachte.

Diese kleinen Kolonien erreichten noch nicht die Größe eines Stecknadelkopfes. Mikroskopisch fanden sich feine Stäbchen, etwas kleiner als normal, die Beweglichkeit war lebhaft. Von einem hochwertigen Typhusimmunserum (Titer 1 : 10 000) wurden sie zunächst nur bis zur Verdünnung 1 : 1000 deutlich agglutiniert; später wurden sie normal agglutinierbar.

Trotz vielfachen Weiterzüchtens auf Drigalski- und gewöhnlichem Agar war keine Änderung in dem Wachstum festzustellen. Auf Endoagar und Drigalskiagar mit Zusatz von Natriumsulfit analog dem Endoagar war das Wachstum normal, jedoch trat sofort bei Rückimpfung auf natriumsulfitfreie Nährböden die Hemmung wieder in Erscheinung.

Daß die Hemmung durch die Autoklavierung zustande käme, nahm Gildemeister nicht an, da auch auf agarfreiem Löfflerserum selbst nach vielen Passagen nur kümmerliches Wachstum zu beobachten war. Durch 7tägige Bebrütung der Zwergstämme in Bouillon gelang es ihm, ebenfalls große Kolonien auf Drigalskiagar zu züchten, die von da an ungehemmt weiterwuchsen. Aber im Gegensatz zu Jacobsen gelang es ihm, diese groß gewordenen Stämme nach 4 Monate langem Wachstum in Bouillon wieder in die Zwergform zurückzuführen.

Außerdem untersuchte Gildemeister noch die Säureausflockung nach Michaelis. Diese Reaktion fiel zunächst negativ aus, wurde aber später leicht positiv.

Später gewann Gildemeister noch 6mal in Stuhlausstrichen von Typhuskranken „gehemmte" Typhuskolonien, aber sie unterschieden sich insofern vom Typ Jacobsen, als sie nie rein zu gewinnen waren, stets verschiedene, z. T. bizarre Formen, und auf Endoagar das gleiche Verhalten wie auf Drigalskiagar zeigten. Hier liegt der Gedanke an eine Bakteriophagenwirkung nahe.

Über den klinischen Verlauf jener Güstrower Typhusepidemie im Jahre 1927/28 ließ sich jetzt nur noch feststellen, daß die Erkrankungen alle sehr schwer waren. Drei Fälle endeten tödlich. Auch der Rostocker Fall vom Frühjahr 1934 verlief sehr schwer und führte zum Tode. Im Gegensatz dazu berichten Jacobsen und Gildemeister nichts von Todesfällen, Goebel erwähnt, daß eine schwere Erkrankung vorlag, und bei Fromme verlief die Erkrankung letal.

B. Untersuchungen an 8 eigenen Stämmen

1. Morphologie der Bakterien und ihrer Kolonien

Zu unseren Untersuchungen standen uns von der Güstrower Epidemie vor sieben Jahren noch sieben Stämme (benannt 9, 11, 14, 17, 18, 23, 26) zur Verfügung; zu ihnen kam als achter der 1934 bei dem Typhuskranken in Rostock gefundene (als Stamm Schr. bezeichnet).

Die mikroskopische Untersuchung dieser Stämme im hängenden Tropfen zeigt lebhaft bewegliche Bakterien, die kreuz und quer rasch durch das Gesichtsfeld wandern. Die Gramfärbung ergibt gramnegative, an den Ecken abgerundete Stäbchen, deren Größe von langen Stäbchen bis zur Kokkenform variierte. Die Stämme wurden zu diesen Untersuchungen von Drigalskiagar entnommen.

Auf Drigalskiagar fiel ihr kümmerliches Wachstum auf. Es wuchsen längs des Striches sehr winzige, zarte, wasserhelle Kolonien, die den Nährboden färberisch nicht veränderten, während normale Typhusstämme, als Kontrolle auf die Platten verimpft, normales Wachstum zeigten. Die Größe der Kolonien wurde mit Okular- und Objektmikrometer nach Zeiß gemessen. Um auch möglichst viele einzeln liegende, sich nicht gegenseitig im Wachstum hindernde Kolonien zu erhalten, wurde von einer Schrägagarkultur eine sehr stark verdünnte Aufschwemmung mit NaCl-Lösung gemacht. Hiervon wurde dann auf extra dicken Drigalskiplatten ausgestrichen. Nach 24stündigem Brutschrankaufenthalt errechneten wir den Durchmesser von je sechs Kolonien jeder Platte und erhielten folgende Werte als Durchschnitt:

Zwergstämme: 0,41 mm,
Normalstämme: 1,90 mm.

Bei den verschiedenen Stämmen traten Schwankungen in der Größe auf, die sich in folgenden Grenzen hielten:

Zwergstämme: 0,22—0,70 mm,
Normalstämme: 1,65—2,23 mm.

Die kleinwachsenden Stämme haben nach 24 Stunden also nur rund ¼ der Größe der Normalstämme.

Jacobsen beschreibt die Größe seines Typhusstammes als höchstens stecknadelkopfgroß, während Fromme und Goebel nur von äußerst winzigen Kolonien sprechen. Es ist also anzunehmen, daß ein Größenunterschied zwischen unseren Stämmen und den ihrigen nicht vorhanden ist.

Dieses kümmerliche Wachstum trat auch auf gewöhnlichem Agar auf, eine Beobachtung, die jene drei Verfasser auch gemacht haben. Fromme maß ihre Größe hier nach 24 Stunden mit 1—1½ mm.

Auf Gelatineplatten war ein Größenunterschied zwischen den kleinwachsenden und den normalen Stämmen nicht festzustellen. Aber alle Zwergstämme zeigten eine eigentümliche Zerfaserung der Kolonien, während die Normalstämme die typische Weinblattform, immer von feinen Adern durchzogen, bildeten. Ein Normalstamm jedoch wies neben normalen Kolonieformen auch solche zerfaserte auf.

Außer diesen Abweichungen in Größe und Form der Kolonien fanden wir morphologisch an den Stämmen und ihren Kolonien zunächst nichts Besonderes. Ihre fermentativen Fähigkeiten wurden noch an einer größeren

Anzahl der bei der Typhusdiagnose gebräuchlichen Nährböden geprüft. Stets liefen in den Versuchen Normalstämme parallel.

Auf Endoagar war kein Unterschied zwischen den kleinwachsenden und normalen Stämmen festzustellen.

Bouillon wurde gleichmäßig getrübt.

Milch wurde nicht vergoren.

In Neutralrotagar trat keine Gasbildung ein.

In Trypsinbouillon wurde kein Indol gebildet, während sich in den Kontrollen mit Colibakterien Indol nachweisen ließ.

Barsiekow I zeigt nur eine leichte Rötung,

Barsiekow II blieb unverändert.

Es verhielten sich hier also die Zwergstämme so, wie wir es von Typhusstämmen erwarten und wie die parallel angesetzten normalen Stämme.

2. Abspaltung normalwachsender Stämme

Bevor auf die weiteren Untersuchungen der Eigenart dieser Stämme und der Ursache dieser Abspaltung eingegangen sei, muß auf eine andere, bereits von Jacobsen gemachte Beobachtung hingewiesen werden.

In seinem Bericht gibt Jacobsen an, daß sich plötzlich nach 3tägigem Brutschrankaufenthalt große Typhuskolonien zwischen den kleinen entwickelt hätten, die — isoliert weitergezüchtet — groß blieben und sich in allen Versuchen wie normale Stämme verhielten. Es gelang nicht, einen Unterschied zwischen Normalstämmen und diesen Stämmen zu finden, die von den im übrigen auch weiterhin kleinwachsenden Kulturen abgespalten waren, und die er B-Stämme nannte. Er bezeichnet sie als echte Mutation. Rückschläge in die ursprüngliche Form sah er im Gegensatz zu Gildemeister nie.

Gildemeister dagegen gelang es, aus einer 7 Tage alten Bouillonkultur von Zwergformen zu der normalen großen Form zu kommen, ja sogar aus dieser über eine vier Monate alten Bouillonkultur wieder Zwergformen zu gewinnen. Diese letzten Kulturen sind aber nicht untersucht; es ist auch nichts über Kontrollversuche mit Normalstämmen berichtet. So wird wohl die letzte Beobachtung denen von Eisenberg 1914 und Bernhardt 1915 an alten Kulturen nahe zu stellen sein.

Goebel und Fromme erwähnen dazu, daß es ihnen nicht gelungen sei, solche Stämme zu züchten.

Uns war es möglich, Jacobsens Beobachtung in gewisser Weise zu bestätigen. Zunächst traten bei sechs der acht Stämme wiederholt größere Kolonien, allerdings erst meist nach frühestens drei Tagen, auf. Wurden diese Kolonien weiterverimpft, so wuchsen aus ihnen — mit zwei Ausnahmen — nicht wieder große Kolonien, sondern nur kleine, aus denen sich mit der gleichen Unregelmäßigkeit und Seltenheit wie aus den ursprünglichen Kulturen einzelne große abspalteten. Es war nicht möglich, von diesen sechs Stämmen einen dauernd groß wachsenden abzuspalten, bei den erwähnten zwei Ausnahmen handelt es sich um die Stämme 11 und Schr. Bei diesen traten die großen Kolonien mit der gleichen Unregelmäßigkeit auf wie bei den anderen kleinen Stämmen, aber es zeigte sich, daß nach isoliertem Ausstreichen einer solchen großen Kolonie nach 24 Stunden nicht wie oben wieder nur kleine Kolonien auftraten, sondern auch in weiteren

Passagen nur noch groß wachsende Stämme, nach Jacobsen B-Stämme genannt. Die Isolierung geschah auf Drigalskiagar.

Zwei der acht Stämme bildeten nie große Kolonien. Auch die Beobachtung Gildemeisters, aus 7tägigen alten Bouillonkulturen große Stämme zu gewinnen, konnten wir nicht bestätigen. Das Wachstum zeigte auf Drigalskiagar nur wieder die kümmerlichen Formen.

Bei Jacobsen wichen diese durch Abspaltung neu gewonnenen Stämme in der Morphologie ihrer Kulturen und den biochemischen Fähigkeiten nicht mehr von der Norm ab. Bei uns dagegen zeigten sie doch einige geringe Abweichungen, auf die sofort und bei Besprechung der Säurebildung näher eingegangen sei.

3. Kulturelle Untersuchungen

a) Allgemeine Untersuchungen und Autoklavierung.

Jacobsen vermutet anfangs, daß das Kristallviolett im Drigalskiagar eine hemmende Wirkung auf gewisse Stämme ausübe, und so bei ihnen die Kleinwüchsigkeit hervorrufe. Seine Vermutung bestätigte sich aber nicht. Im Zusammenhang mit der Nachprüfung seiner Versuche untersuchten wir, ob überhaupt und in welcher Konzentration Kristallviolett eine Hemmung auf das Wachstum ausübe. Dazu wurden Bouillonröhrchen verwendet, denen 0,1%ige Kristallviolettlösung in verschiedenen Mengen zugesetzt wurde. Dann wurden gleichmäßige Mengen von Typhusmaterial eingeimpft. Es zeigte sich schließlich, daß ungefähr bei einer Verdünnung von 0,1‰ Kristallviolett und einer Einwirkungsdauer von 24 Stunden die Grenze der Abtötung liegt. Es wuchsen bei Abimpfung auf Agar von den Zwergstämmen nach 24 Stunden nur noch einzelne Kolonien (bei noch stärkerer Konzentration war kein Wachstum mehr nachzuweisen). Dagegen waren die Normalstämme gegenüber dieser Konzentration noch resistent. So verhielten sich doch die beiden Arten dem Kristallviolett gegenüber verschieden. Jacobsen ist der Unterschied entgangen, weil er nähere Untersuchungen nicht gemacht hat.

Auf Grund dieser Beobachtung wurde das Verhalten aller Typhusstämme gegenüber 0,05, 0,1 und 0,2‰igen Kristallviolett in Bouillon eingehender untersucht. Um möglichst gleichmäßige Bedingungen zu schaffen, wurden vorher alle Stämme auf gewöhnliche Agarplatten überimpft. Nach 24 Stunden wurde davon eine möglichst gleichmäßige, dünne NaCl-Aufschwemmung hergestellt, von der dann je 0,2 ccm in 5 ccm Kristallviolettbouillon überimpft wurden. Nach 12, 24 und 48 Stunden Brutschrankaufenthalt wurden je 2 Ösen auf Agarplatten ausgestrichen. Das folgende Protokoll gibt die Ergebnisse wieder, wie sie ähnlich auch bei einer Wiederholung gewonnen wurden:

Zeit:	nach 12 Stunden			nach 24 Stunden			nach 48 Stunden		
Kristallviolettkonz.:	0,05 ‰	0,1 ‰	0,2 ‰	0,05 ‰	0,1 ‰	0,2 ‰	0,05 ‰	0,1 ‰	0,2 ‰
Zwergstämme	++	+	–	+	⊙	–	+	–	–
B-Stämme . .	–	–		–	–	–	–	–	–
Normalst. . .	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	⊙

Danach sind unsere B-Stämme keineswegs Normalstämme, ihre Kristallviolettempfindlichkeit ist im Gegenteil sogar noch größer als die der kleinwüchsigen.

Wenn also auch stimmt, daß das Kleinwachsen nicht auf einer Hemmung durch das Kristallviolett im Drigalskiagar beruht, so besteht doch eine verschieden starke Empfindlichkeit der groß- und kleinwachsenden Typhusstämme gegenüber dieser Substanz.

Gildemeister fand, daß auch auf Löfflerserum Hemmung eintritt. Diese Beobachtung konnten auch wir bestätigen. Unsere Serumplatten zeigten nach 24 Stunden Bebrütung, beimpft mit Material aus Bouillonkulturen, folgendes Ergebnis:

	nach 24 Stunden	nach 48 Stunden
Zwergstämme	○	○
B-Stämme . .	⊙	⊙
Normalstämme	†	†

○ = Hemmung
⊙ = normales und kümmerliches Wachstum gemischt
† = normales Wachstum

Nach 48 Stunden Brutschrankaufenthalt wuchsen zwischen den winzigen Kolonien bei drei Zwergstämmen einzelne große Kolonien. Diese Abspaltungen wurden isoliert auf Drigalskiagar ausgestrichen, worauf nach 24 Stunden aber nur ganz winzige Kolonien gewachsen waren.

b) Untersuchungen zur Aufhebung der Hemmung.

Ferner hatte Jacobsen noch Untersuchungen mit Uschinski-Agar, dem er verschiedene Eiweißstoffe zusetzte, angestellt. Mit einigen dieser Zusätze wiederholten wir diese Versuche:

Wachstum nach 24 Stunden:

Zusatz zum U.-Agar	Zwergst.	B-Stämme	Normalst.
1 % Liebigs Fleischextrakt	○	⊙	⊙
1 % Pepton Witte	○	†	†
10 % Hühnereiweiß . . .	○	○	○
20 % Hühnereiweiß . . .	○	○	○
10 % Hühnereidotter . .	†	†	†

Zum Unterschied von Jacobsen, der bei Zusatz von Liebigs Fleischextrakt bei seinen B-Stämmen normales Wachstum erzeugte, gelang es uns nicht, die Hemmung dadurch völlig zum Verschwinden zu bringen. Es war wohl ein besseres Wachstum zu beobachten, aber doch noch nicht normales. Bei Pepton Witte gilt dieser gleiche Unterschied für die B-Stämme, während die Normalstämme dickes, ungehemmtes Wachstum aufwiesen. Hühnereidotter hebt wie bei Jacobsen die Hemmung auf, während Hühnereiweiß auch bei 20% Zusatz die Hemmung nicht zum Verschwinden bringt.

In Bouillon, Neutralrotagar, Trypsinbouillon, Basickow I und II unterscheiden sich die B-Stämme nicht von den normalen.

Da sich die Erklärung, daß das Kristallviolett die Ursache sei, nicht halten ließ und diese ja auch für das Kleinwachsen auf Agar und Drigalskinährböden ohne Kristallviolettzusatz nicht gelten konnte, nahm Jacobsen an, daß durch die langdauernde Erhitzung der Nährböden Umsetzungen in ihnen stattfinden, infolge deren seine empfindlichen Typhusstämme dann nicht mehr normal wachsen könnten. Diese Annahme fand er bestätigt als es ihm gelang, durch nur ¼stündige Autoklavierung der zur Verwendung kommenden Nährböden die Hemmung zu beseitigen. Goebel und Fromme konnten diese Versuche nicht bestätigen, und auch uns gelang es nicht, auf diese Weise die Hemmung zum Verschwinden zu bringen. Hier besteht also ein Gegensatz zu den Beobachtungen von Jacobsen. Gildemeister hat die Wirkung verkürzter Erhitzungszeit offenbar nicht geprüft, er mochte in längerer Autoklavierung und dadurch gesetzter Veränderung des Nährbodens die Ursache der Hemmung auch deshalb nicht sehen, weil er das kümmerliche Wachstum auch auf Serumplatten, also auf einem Nährboden ohne Agarzusatz, beobachtete. Jacobsen, Goebel und Fromme prüften ihre Stämme auf diesen Nährböden nicht; unser Versuch (aus 24 Stunden alten Bouillonkulturen eine Öse auf Serumplatten) bestätigte Gildemeisters Befund. Das Wachstum war so winzig auf den mit Zwergstämmen beimpften Platten, daß die Kolonien nur mit der Lupe klar zu erkennen waren, während die Normalstämme dickes Wachstum aufwiesen. Nach 48stündigem Brutschrankaufenthalt zeigten sich bei den Zwergsstämmen 11, 14, 26, Schr einzelne große Kolonien, die — isoliert ausgestrichen — nach 24 Stunden auf Drigalskiagar nur ganz winzige Kolonien erkennen ließen.

Gewisse Versuche zur Aufhebung der Hemmung führten zu übereinstimmenden Ergebnissen. Sowohl Jacobsen, wie auch Fromme und Goebel, fanden, daß durch Zusatz von schwefelhaltigen Substanzen zum Drigalskiagar, also Na_2SO_3, SO_2, NH_4SH die Hemmung völlig zu beseitigen war. Daraus erklärte es sich auch, daß auf dem Endoagar, der Natriumsulfit enthält, keine Hemmung auftrat.

Wir prüften deshalb Jacobsens Versuche mit Na_2SO_3-Zusatz zum Drigalskiagar erneut nach und fanden:

(Zusatz in pro Mille)

	Zwergst.	B-Stämme	Normalst.
0,05 Na_2SO_3	○	†	†
0,1	⊙	†	†
0,5	†	†	†
1,0	†	†	†
1,5	†	†	†
2,5	†	†	†

○ = Hemmung, † = Aufhebung der Hemmung

Wir finden also Jacobsens Ergebnisse bestätigt, daß ein Zusatz von Na_2SO_3 von 0,5% an die Hemmung aufhebt, während noch geringere Zusätze ohne Einfluß auf das Wachstum bleiben. Bei einem Zusatz von 0,1‰ trat bisweilen schon ein etwas verstärktes Wachstum auf. Die von uns gefundenen kleinwachsenden Typhusstämme verhielten sich bei dieser Ver-

suchsreihe sämtlich wie der Stamm von Jacobsen. Das gleiche gilt auch für die B-Stämme.

c) Gärungsvermögen.

Da verschiedene Stämme in ihrem Zuckervergärungsvermögen, wie bereits erwähnt, sich nicht gleich verhalten, wurde dies von uns besonders untersucht. Jacobsen hob eine verspätete Mannit-Vergärung hervor: Säuerung machte sich erst nach zirka 50 Stunden statt nach 12 Stunden bemerkbar. Goebel fand in der Mannitvergärung nichts abweichendes, Fromme und Gildemeister haben offenbar darauf nicht untersucht.

d) Säurebildung.

Auch bei uns war nach 24 Stunden nur eine ganz schwache Säuerung der Zwergstämme festzustellen; ebenso minimal war die Säurebildung durch die B-Stämme, während die normalen Kontrollstämme und auch Stamm Schr. deutliche Rötung des Nährbodens verursachten. Nach 48 Stunden war auch bei den Zwerg- und B-Stämmen eine verstärkte Säuerung zu erkennen, die aber nicht den hohen Grad der Normalstämme erreichte. Unsere Stämme verhalten sich also genau wie der Stamm von Jacobsen.

Als weitere Abweichung berichtet Fromme, aber nur er, daß auf Drigalskiagar die Kolonien seines Typhusstammes deutliche Rötung gezeigt hätten. Etwas Derartiges beobachteten wir nicht. Ferner berichtet er, daß in Lackmusmolke erst nach 3 und mehr Tagen geringe Säuerung aufgetreten wäre. Auch geschah dies nur bei einem Teil seiner Stämme und war im einzelnen nicht konstant. Gildemeister und Goebel sagen hierüber nichts: Jacobsen erwähnt, daß sein Bact. typhi mutabile sich normal verhalten habe. Wir konnten deutliche und konstante Unterschiede niemals beobachten, die leichte Säuerung trat wie bei Normalstämmen nach 24 Stunden auf.

Dagegen fanden wir bei Untersuchungen in Barsiekow I, daß sich eine etwas tiefere Rötung des Lackmuszusatzes bei den Normalstämmen entwickelte als bei unseren Zwergstämmen. Für eine genauere Untersuchung wurden deshalb gleiche Mengen von Bakterien der verschiedenen Stämme in gleichen Mengen Barsiekow I nach gleicher Bebrütungszeit untersucht. Der entstandenen Säure setzten wir $n/_{100}$-Natronlauge bis zur Neutralisation des Farbindikators zu. Es ergaben sich aber solche unregelmäßige Unterschiede in den Ergebnissen, daß statt des groben Verfahrens ein besseres gewählt werden mußte. Erstens war der Augenblick des Farbumschlages nur sehr ungenau zu bestimmen, so daß sich hieraus schon eine beträchtliche Fehlerquelle ergab, und zweitens koagulierte zum Teil auch der Nährboden unter Änderung seiner Farbe, so daß eine Bestimmung überhaupt nicht mehr vorgenommen werden konnte. Auch der Versuch, den Farbstoff erst kurz vor der Titration hinzuzusetzen, scheiterte.

Wir gingen deshalb einen anderen Weg und benutzten den ph-Bestimmungsapparat nach Dr. G. Roeder.

Zuerst prüften wir die Genauigkeit des Apparates in einer Reihe von Versuchen mit Hilfe von Pufferlösungen mit bekannter Wasserstoffionenkonzentration. Als Ergebnis fanden wir, daß die Werte auf die erste Dezimale genau stimmten, während die zweite Dezimale noch annähernd genau war.

Wir untersuchten nun zunächst vier Kolben Barsiekow I-Lösung, deren ph-Wert 6,89 war, mit ein und demselben Normalstamm in gleicher Menge beschickt, unter gleichen Bedingungen. Eine Säurebildung war bereits nach 2 Stunden meßbar und selbst nach 7 Tagen noch nicht abgeschlossen. Dabei war die Säurebildung durch den gleichen Typhusstamm in den vier Kolben sehr verschieden, denn nach 7 Tagen bestand eine Differenz zwischen den ph-Werten von ph = 4,31 bis ph = 5,41. Das sind Unterschiede weit über die normalen Fehlergrenzen hinaus. Weitere vier Normalstämme, die wir untersuchten, zeigten nach 7 Tagen ph-Werte von ph = 4,53 bis ph = 6,01. Es ist also festzustellen, daß die Säurebildung bei den normalen Typhusstämmen nicht konstant erfolgt und großen Schwankungen unbekannten Ursprungs unterworfen ist.

Wie zu erwarten war, erhielten wir natürlich auch bei den Untersuchungen mit den Zwergstämmen und den B-Stämmen sehr unterschiedliche Werte. Wir prüften den Säuregrad regelmäßig nach 24 Stunden fünf Tage hindurch, es wurden alle Zwerg- und B-Stämme untersucht. Eine Säurebildung konnte bereits nach 24 Stunden bei unseren Stämmen nachgewiesen werden, wenn sie auch geringer war als bei den normalen Kontrollstämmen. Wir haben deshalb, um besser vergleichen zu können, Durchschnittswerte genommen. Bei allen untersuchten Zwergstämmen und B-Stämmen war nach 5 Tagen noch kein Stillstand in der Säurebildung eingetreten.

Wir erhalten also folgende Tabelle:
(die Zahlen geben die abgelesenen ph-Werte an)

Ty-Stamm	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
Zwergstämme .	6,32	5,78	5,54	5,49	5,41
B-Stämme . .	6,34	5,92	5,49	5,49	5,44
Normalstämme	6,22	5,91	5,49	5,38	5,31

Die Zwergstämme und B-Stämme unterscheiden sich also in ihrem Säurebildungsvermögen nur ganz unwesentlich von einander, dagegen erreichen sie nicht den Säuregrad der Normalstämme, da ihre ph-Werte im Durchschnitt über den Werten der Normalstämme liegen.

e) Verhalten gegenüber Bakteriophagen.

Wir vermuteten als Ursache des kümmerlichen Wachstums die Wirkung eines Bakteriophagen, der aber nur schwach war, da er ein Wachstum nicht gänzlich zu hindern vermochte. Um nun die Bakteriophagen anzureichern, filtrierten wir mit Zwergstämmen beschickte Bouillonröhrchen durch Kerzenfilter und verteilten dieses Filtrat auf neue mit denselben Stämmen beimpfte Bouillonröhrchen, die dann nach 24 Stunden wiederum filtriert wurden. Zwischendurch wurde der gleiche Stamm auf Drigalskiagar ausgespatelt und ein Tropfen des Filtrates darüberlaufen gelassen. Trotz neunmaliger Passagen zeigte sich nicht die geringste Lochbildung oder Granulierung als Zeichen einer Bakteriophagenwirkung.

So glauben wir nicht, daß eine Bakteriophagenwirkung als Ursache des Kleinwachstums in Betracht kommt. Um zu untersuchen, ob es sich vielleicht um gegen Bakteriophagen resistente Stämme handelt, nahmen wir einen Typhusbakteriophagen aus dem Hygienischen Institut und prüften

damit Normal- und Zwergstämme. Die Untersuchungen geschahen auf Drigalskiplatten. Wir erhielten folgendes Ergebnis:

Normalst.	n. 24 Std.	n. 48 Std.	Zwergst.	n. 24 Std.	n. 48 Std.	n. 3 Tagen
4271	++	++	9	++	++	++
3494	++	++	11	++	++	++
4157	++	++	11 B	++	++	++
2652	++	++	14	+	+	+
4469	++	++	17	—	—	—
3974	++	++	18	++	++	++
1890	++	++	23	++	++	++
3425	++	++	26	—	—	—
			Schr.	+	+	+

++ = sehr starke Wirkung, + = geringere Wirkung, — = keine Wirkung

Alle Normalstämme waren also sehr empfindlich. Der Bakteriophage fraß große Löcher in den Typhusrasen, die gänzlich frei von Kolonien waren. Ebenso reagierten fünf Zwergstämme positiv, während bei zwei Zwergstämmen keine Wirkung zu erkennen war.

Unsere Versuche, mit Hilfe dieses Bakteriophagen aus den zwei resistenten Zwergstämmen einen arteigenen zu züchten, scheiterten trotz neunfachen Filtrierens. Wir sind danach zu der Überzeugung gekommen, einen Bakteriophagen als Ursache der Hemmung nicht anschuldigen zu können.

f) Serologische Untersuchungen.

Das wesentliche Merkmal des „Bact. typhi mutabile" war bei Jacobsen neben dem kümmerlichen Wachstum auf Drigalski- und gewöhnlichem Agar und der verspäteten Mannitvergärung der Mangel an Agglutinierbarkeit. Erst 3—4 Monate, nachdem es aus dem Kranken herausgezüchtet war, wurde es agglutinabel; Frommes und Goebels Typhusbakterien dagegen reagierten sofort gut.

Wir untersuchten unsere Stämme, die sämtlich bei ihrer Gewinnung aus dem Krankenmaterial agglutinabel gewesen waren, ohne daß dabei besondere Schwierigkeiten aufgetreten gewesen wären, zunächst, indem wir Abschwemmungen von gewöhnlichem Agar und ein Immunserum der Merk-Werke mit dem Titer 1 : 20 000 verwendeten.

Das Ergebnis gibt das folgende Protokoll:

Ty-Stämme	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16 000	1:32 000	Na-Cl.-Kontr.
4469	3	3	3	2	2	1	±	—
3425	3	4	3	2	2	1	±	—
1890	2	3	2	2	1:2	1	±	—
2652	2:3	1	2	2	2	1	±	—
Schr.B.	3	2	1:2	2	1	±	—	—
11 B	2	2	2	2	1:2	1	—	—
9 B	1	1	1	1	1	±	—	—
Schr.	2	2	2	2	1	±	—	—

Ty-Stämme	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16 000	1:32 000	Na-Cl.-Kontr.
26	1	2	2	2	1:2	1	—	—
23	3	2:3	2:3	2	1:2	1	±	—
18	1	1:2	1:2	1	1	1	—	—
17	2	2	2	1:2	1	1	—	—
14	1	1	1	1	1	1	—	—
11	3	2	2	1:2	1	1	—	—
9	2	1:2	1	1	1	1	—	—

Irgendein bezeichnender Unterschied der groß und kleinwachsenden Stämme läßt sich hieraus nicht ablesen. Einige der Stämme sind verhältnismäßig schlecht agglutinabel und erreichen nicht den Titer der Normalstämme, aber die Unterschiede sind nur gering. Auch zwischen Zwerg- und B-Stämmen bestehen keine wesentlichen Differenzen.

Zu den weiteren serologischen Untersuchungen wurden Immunsera von den Zwergstämmen hergestellt. Zu ihrer Gewinnung wurden zwei Kaninchen geimpft. Ein Schrägagarkulturröhrchen wurde mit 6 ccm Kochsalzlösung abgeschwemmt, die Aufschwemmung dann 1 Stunde bei 60° gehalten.

Kaninchen 428 erhielt intravenös 1 ccm Aufschwemmung vom Stamm Schröder,

Kaninchen 444 intravenös 1 ccm von einem Gemisch der Güstrowstämme 9/17/18/23.

Eine 2. und 3. Impfung erfolgte nach jeweils 6 Tagen mit dem gleichen Material. Nach nochmals 6 Tagen wurden die beiden Kaninchen ausgeblutet. Die Austitrierung der Sera ergab:

Serum 428 (Schröder):

Ty-Stämme	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16 000	1:32 000	1:64 000	1:128 000	1:256 000	Na-Cl-Kontrolle
9	3	2	1:2	1	1	+	(+)	—	—	—
11	2:3	2	2	1	1	+	(+)	—	—	—
14	3:4	2:3	1:2	1	1	+	(+)	—	—	—
17	3	2	1:2	1	1	+	(+)	—	—	—
18	3	2	1:2	1	1	+	(+)	—	—	—
23	2:3	2	1:2	1	1	+	(+)	—	—	—
26	3	2	1	1	1	+	(+)	—	—	—
Schr. B	3	1:2	1:2	1	1	1	+	—	—	—
Schr.	2:3	2:3	2	1	1	+	(+)	—	—	—
6790	3	2:3	2	1	1	+	(+)	—	—	—
6757	3	3	2	1:2	1	1	+	—	—	—
6663	2	2	1:2	1	1	±	(+)	—	—	—
5750	3	2	1	1	1	±	(+)	—	—	—

Serum 444 (Güstrow):

Ty-Stämme	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16 000	1:32 000	1:64 000	1:128 000	1:256 000	Na-Cl-Kontrolle
9	3:4	3:4	3	2:3	1:2	+	—	—	—	—
11	3	3	2	1:2	1	+	—	—	—	—
14	3	2	2	1	1	+	—	—	—	—
17	2:3	2:3	2	1	1	+	—	—	—	—
18	3	2	1	1	1	+	—	—	—	—
23	3	2	1:2	1:2	1	+	—	—	—	—
26	3	3	2	1:2	1	+	—	—	—	—
Schr. B	2:3	2:3	2	2	1	1	(+)	—	—	—
Schr.	3	2:3	2:3	2	2	1	(+)	—	—	—
6790	3	3	2:3	2	1	1	(+)	—	—	—
6757	3:4	3	3	2	1	1	(+)	—	—	—
6663	3	2:3	2	1:2	1	1	(+)	—	—	—
5750	3:4	3	2	1:2	1	1	(+)	—	—	—

Die Sera aus den kleinwachsenden Stämmen verhalten sich demnach den Normalstämmen und den Zwergstämmen gegenüber nicht grundsätzlich verschieden.

Zur weiteren Receptorenanalyse wurden Typhus-Immunserum von Merk und unser Serum 428 (Schröder) mit normalen und kleinwüchsigen Typhusbakterien abgesättigt und die Sera dann auf die darin gebliebenen Agglutinine untersucht. Im einzelnen wurde in folgender Weise vorgegangen:

I a. 2,5 ccm Merk-Typhusserum 1 : 50 wurde mit 2,5 ccm sehr dichter Kochsalzaufschwemmung von Normalstamm 4469 gemischt, 2 Stunden im Brutschrank, 4 Stunden im Eisschrank aufbewahrt und anschließend 15 Minuten zentrifugiert. Das daraus gewonnene Serum werde zu einer Ausagglutination mit demselben Normalstamm 4469 und einem Gemisch der Zwergstämme 17/18 benutzt.

I b. Derselbe Versuch wurde angesetzt mit 2,5 ccm Merk-Typhusserum, abgesättigt mit 2,5 ccm einer dichten Na-Cl-Aufschwemmung der Zwergstämme 17/18. Die Ausagglutination erfolgte mit den gleichen Stämmen 4469 und 17/18.

II a/b. Entsprechend I a und b, nur wurde dabei an Stelle des Merk-Serums unser mit dem Stamm Schr. hergestelltes Immunserum 428 verwendet. Das Ergebnis, abgelesen nach 24stündigem Brutschrankaufenthalt, bringt das folgende Protokoll:

Serum	abgesättigt mit	ausagglutiniert mit	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16 000
Merk	4469	4469	2	1	1	±	(±)	–
Merk	4469	17/18	1	±	–	–	–	–
Merk	17/18	4469	2	1:2	1	±	(±)	–
Merk	17/18	17/18	±	(±)	–	–	–	–
Schr.	4469	4469	4	3	2	1	–	–
Schr.	4469	17/18	1:2	1	+	(±)	–	–
Schr.	17/18	4469	4	3	2	1	–	–
Schr.	17/18	17/18	1	±	(±)	–	–	–

Die Menge der nach der Absättigung im Serum 428 verbliebenen Agglutinine ist etwas größer als die im Merk-Serum, aber grundsätzliche Unterschiede bezüglich der Receptoren der Normal- und Zwergstämme lassen sich aus dem Protokoll nicht herauslesen.

C. Zusammenfassung

1. Das Vorkommen von auf gewissen Nährböden kleinwachsenden Typhusstämmen, die Jacobsen als Bact. typhi mutabile bezeichnet hat, wird grundsätzlich bestätigt.

2. Die nähere Untersuchung ergab aber, daß unsere kleinwachsenden Typhusstämme einmal nicht alle die Eigenschaften zeigen, wie sie bei anderen Autoren beschrieben sind, dann aber auch ihre Besonderheiten haben.

3. Die Versuche zur Klärung der Ursache dieser besonderen Eigenschaften zeigen, daß die Veränderung nicht durch äußere Einflüsse verursacht sein kann, sondern wahrscheinlich auf eine Mutation der Bakterien selbst zurückgeht.

Literatur

1. Bernhardt, Georg: Über Variabilität pathogener Bakterien. Ztschr. f. Hyg. Bd. 79. 1915. p. 179.
2. Eisenberg, Philipp: Über Mutationen bei Bakterien und anderen Mikroorganismen. Ergebnisse der Immunitätsforschung, Bd. 1. 1914. p. 28.
3. Fromme: Über einen atypischen Typhusstamm. Zentralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 58. 1911. p. 445.
4. Gildemeister, E.: Über Variabilitätserscheinungen des Typhusbacillus, die bereits bei seiner Isolierung aus dem infizierten Organismus auftreten. Zentralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 78. 1916. p. 209.
5. Goebel: Über einen atypischen Typhusstamm. Zentralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 75. 1915. p. 376.
6. Jacobsen, K. A.: Mitteilungen über einen variablen Typhusstamm (Bact. typhi mutabile), sowie über eine eigentümliche hemmende Wirkung des gewöhnlichen Agar, verursacht durch Autoklavierung. Zentralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 56. 1910. p. 208.

Am Schlusse meiner Arbeit möchte ich nicht versäumen, Herrn Professor Dr. Winkler für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung während der Arbeit zu danken.

Lebenslauf

Ich, Oskar Wolfgang Heber, wurde am 28. Februar 1912 in Döbeln i. Sachsen geboren als Sohn des Herrn Studienrat Heber und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Wolf. Von 1918 bis 1922 besuchte ich die Volksschule und von Ostern 1922 bis 1931 das Realgymnasium in Döbeln, wo ich 1931 meine Abschlußprüfung bestand. Anschließend bezog ich die Universitäten Greifswald, Innsbruck, Kiel und Rostock, wo ich im November 1934 meine zahnärztliche Staatsprüfung ablegte.